Versuche zur kontinuierlichen Elutionselektrophorese an Stärkegel

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Jens-Peter Müller

Saarbrücken

1971

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität des Saarlandes

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. F. Krück

Versuche zur kontinuierlichen Elutionselektrophorese an Stärkegel

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1970

vorgelegt von

Jens-Peter Müller

geb. am 31. Juli 1942 in Bonn

Dekan: Prof. Dr. med. G. Dhom
Referent: Prof. Dr. med. W. Leppla

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 15.1.1971 abgelegt.

I N H A L T

		Seite
1.	Einleitung und Aufgabenstellung	1
2.	Hauptteil	3
	2.1 Apparaturbeschreibung	3
	2.2 Methodik der Versuchsdurchführung	7
	2.3 Ergebnisse	16
	2.4 Diskussion	30
3.	Zusammenfassung	35
4.	Literatur	36
5.	Lebenslauf	44

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Die Trägerelektrophorese als Trennmethode von Proteinen, Proteingemischen und einzelnen Proteinfraktionen wurde erstmals 1937 angewandt (KÖNIG, H. 13).

Weitere Verbreitung erlangte die Trägerelektrophorese aber erst nach ihrer Einführung in das Laboratorium durch CONSDEN, GORDON und MARTIN (6) im Jahre 1946.

Weiteste Anwendung fand die Papierelektrophorese, bei der Humanserum in 5 - 6 Fraktionen aufgetrennt wird (Albumin, a_1-, a_2-, ß- und y - Globuline). In neuerer Zeit erbrachte die Verwendung von Membranfolien (Celluloseacetat) eine Laufzeitverkürzung und schärfere Trennung. Die Agargel-Elektrophorese zum Antigen- und Antikörpernachweis fand ihren festen Platz in der Immunologie.

O. SMITHIES (34, 35, 36) führte 1955 das Stärkegel als neues Trägermedium der Elektrophorese ein. Wie bei der Papierelektrophorese können mit Farbstoffen die Proteinfraktionen im Stärkegel angefärbt werden. Quantitative Auswertungen der Stärkegelplatten mittels Densitometrie waren nur möglich, wenn der Träger transparent gemacht wurde (9, 28, 40). Überflüssig wurde diese Methode nach Einführung des

Polyacrylamidgels durch DAVIS und ORNSTEIN (5, 7, 31, 32). Die Stärkegelelektrophorese wurde auch zu präparativen Zwecken eingesetzt (AVRAMAES, U. (2). DUESBERG, P.H. (8). MAIZEL, J. jr. (18). RACUSEN, D. (26). RAVOO, E. (29). SMITH, J. C. (33). STRICKLER, A. (37). SVENSSON, H. (38). Hierzu werden in der Regel die Gelplatten senkrecht zur Wanderungsrichtung der Proteine geschnitten, die erhaltenen Gelabschnitte durch Pufferlösungen mazeriert und die Proteinfraktionen herausgelöst.

Aufgabenstellung der vorliegenden Untersuchung

Ein Versuch, Proteinfraktionen durch Stärkegelelektrophorese in geeignete Pufferlösungen auswandern zu lassen, ist bislang mit befriedigendem Ergebnis noch nicht unternommen worden.

In der vorliegenden Untersuchung soll am Beispiel der Trennung von menschlichen Serumproteinen geprüft werden, ob ein solches Verfahren technisch realisierbar ist. Zu diesem Zweck wurde eine Elektrophoresekammer konstruiert, die ausführlich beschrieben wird.

Die aus dieser Kammer austretenden Serumproteinfraktionen wurden kontinuierlich mittels einer modifizierten FOLIN - LOWRY - Methode (17) in einem Auto Analyser System erfaßt.

2. HAUPTTEIL

2.1 Beschreibung der verwendeten Apparatur

Bei der in allen Versuchen verwendeten Elektrophoresekammer handelt es sich um eine Plexiglasbox, die in folgender Weise zusammengebaut wurde:

Einer Plexiglasplatte (100 x 7 x 5 mm), welche die Rückwand der senkrechtstehenden Elektrophoresekammer darstellt, wird an ihren beiden Längsseiten jeweils ein Plexiglasstab (100 x 10 x 5 mm) der Länge nach mit Acrifix ^{R} aufgeleimt. Dieser Rückwand der Kammer mit den aufgeklebten Plexiglasstäben liegt als Vorderwand eine gleichgroße Plexiglasplatte auf. Diese trägt 25 mm von einer der beiden Schmalseiten entfernt einen Schlitz von 50 mm Länge und 5 mm Breite (Abb. 1 D). Dieser Schlitz dient später zur Aufnahme des in Abbildung 2 dargestellten Gelformers, der im erstarrenden Gel Schlitze zum Probenauftrag ausspart. Man kann entweder die Vorderwand auf die oben erwähnten Plexiglasstäbe aufkleben, oder aber, wie bei der hier beschriebenen Apparatur, Vorder- und Rückwand durch Schrauben verbinden (Abb. 1). Durch die Schraubbefestigung der Vorderwand ist es möglich, die Dicke der Gelschicht zu variieren, indem man auf die mit der Rückwand verbundenen

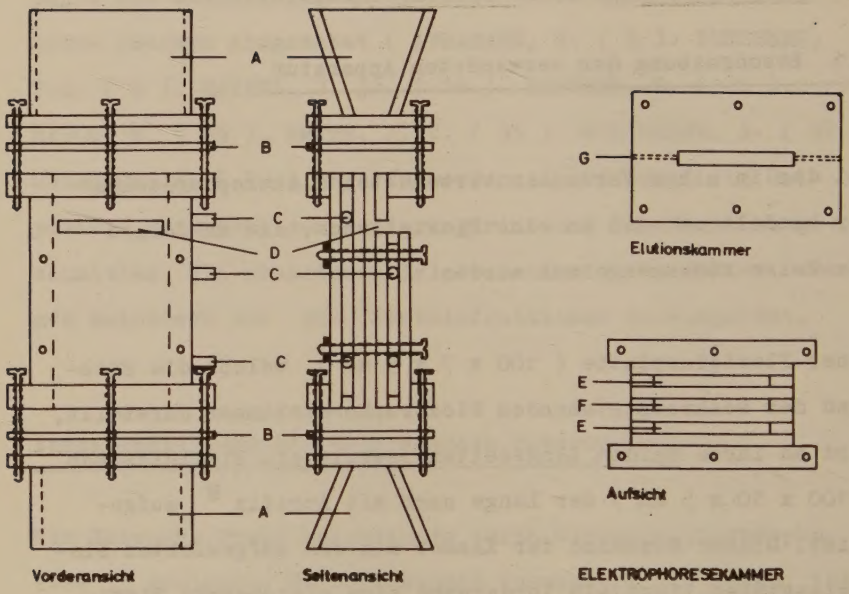


Abbildung 1: Schemazeichnung der verwendeten Apparatur. Eine genaue Konstruktionsanleitung findet sich im Text.

A. Gelansatzstutzen B. Elutionskammern C. Kühlwasserzuflüsse (unten) und Abflüsse (oben) D. Schlitz für den Probenauftrag E. Kühlwasserkammern F. Gelkammer G. Bohrung zur Elutionskammer (1,5 mm Durchmesser)

Plexiglasstäbe geeignete Plexiglasstreifen auflegt. Auf die Hinterseite der Kammerrückwand werden nun an allen vier Seiten 5 mm breite Plexiglasstäbe geklebt, sodaß eine rechtwinklige Wanne entsteht. Diese Wanne wird mit einer der Größe der Kammerrückwand entsprechenden Plexiglasplatte verschlossen. An einer Längsseite der so gebildeten Kühlwasserkammer erfolgt im oberen und unteren Abschnitt je eine Bohrung von 4 mm Durchmesser, durch die Kühlwasser zu- und abgeleitet wird. In diese Bohrlöcher werden Plexiglasröhrchen eingeleimt, auf deren herausstehende Enden die Schläuche des Kühlaggregates geschoben werden (Abb. 1 C).

Eine gleichartige Kühlvorrichtung wird an der Vorderwand der Gelkammer angebracht. (Plexiglasstäbe 70 x 5 x 5 mm, bzw. 60 x 5 x 5 mm, Kühlkammervorderwand 70 x 70 x 5 mm).

An den oberen und unteren Enden der Vorder- und Rückwand sind Plexiglasblöcke angeklebt, welche die Bohrlöcher (2 mm Durchmesser) zur späteren Befestigung von Elutionskammern und Gelansatzstutzen enthalten.

Die Maße der Plexiglasblöcke betragen:

Oberer Block der Rückwand:	70 x 10 x 10 mm
Unterer Block der Rückwand:	70 x 10 x 10 mm
Oberer Block der Vorderwand:	70 x 20 x 10 mm
Unterer Block der Vorderwand:	70 x 10 x 10 mm.

Die Elutionskammern - eine am oberen Ende, die andere am unteren Ende der Elektrophoresebox (Abb. 1 B) - beste-

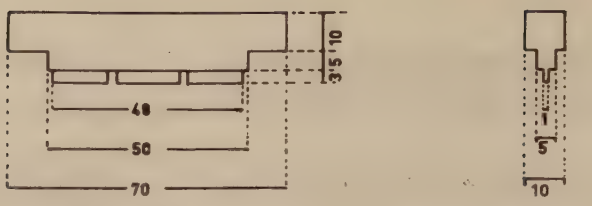
hen aus zwei 70 x 70 x 3 mm großen Plexiglasplatten, bei denen ein dem Gelplattenquerschnitt entsprechender Schlitz von 50 x 5 mm ausgestanzt wurde (Abb. 1). Von beiden Seiten der Platten her wird ein Loch mit 1,5 mm Durchmesser gebohrt (Abb. 1 G) und mit einem zu- bzw. abführenden Schlauch versehen, um durch diese Elutionskammer (Volumen ca. 0,75 ml) einen Pufferstrom leiten zu können (18, 24).

Die Gelansatzstutzen bestehen aus zwei keilförmig aufeinander zulaufenden Plexiglasscheiben von 60 x 30 x 5 mm, die seitlich durch entsprechende trapezförmige Scheiben abgeschlossen sind (Abb. 1 A). Die Bodenplatten der Gelansatzstutzen sind genau wie die Elutionskammern gebaut, jedoch ohne seitliche Bohrungen. Die Plattendicke beträgt statt 3 mm hier 5 mm.

2.2 Methodik der Versuchsdurchführung

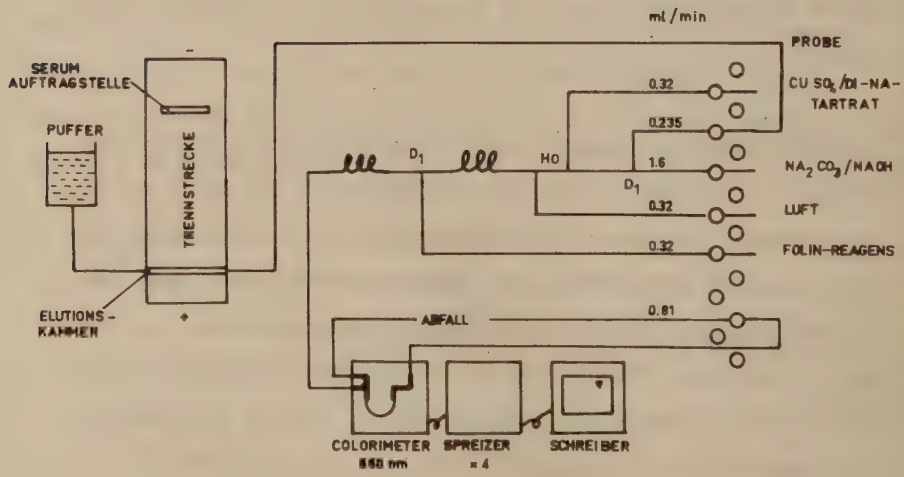
10 g Stärke der Firma Serva Heidelberg (Nr. 35370) werden in 50 ml "Stärkepuffer" pH 8.84 gelöst. Der "Stärkepuffer" setzt sich aus dem "Gelpuffer B" und dem "Gelpuffer C" im Verhältnis 1:1 zusammen (2, 3, 23). 150 ml dieses "Stärkepuffers" werden in einem Wasserbad auf + 84° C erhitzt und dann die Stärkelösung hinzugegeben. Unter dauerndem Umrühren wird die Stärkelösung für 45 sec. weitererhitzt. Anschließend wird die heiße Stärkelösung in einen vorgewärmten Glaskolben umgefüllt. Sodann werden mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe die eingerührten Luftblasen evakuiert (11).

Die Elektrophoresekammer wurde vorher an ihrem unteren Ende mit einer Plexiglasplatte verschlossen. In den hier beschriebenen Versuchen wurde der obere Gelansatzstutzen direkt auf das obere Ende der Elektrophoresekammer ohne Zwischenschaltung einer Elutionskammer aufgeschraubt. In die so vorbereitete Kammer und in den unteren Gelansatzstutzen wird das Gel gegossen, wobei darauf zu achten ist, daß die Geltemperatur beim Gießen 43° C nicht überschreitet (21). Nach Einsetzen des in Abbildung 2 dargestellten Gelformers läßt man das Gel erstarren. Die Abkühlzeit soll mindestens 4 Stunden betragen (1).



GELFORMER FÜR SERUMAUFTRAGSCHLITZE

Abbildung 2: Gelformer für Serumauftragschlitze aus Plexiglas.



FLIESSDIAGRAMM ZUR VOLLAUTOMATISCHEN PROTEINBESTIMMUNG

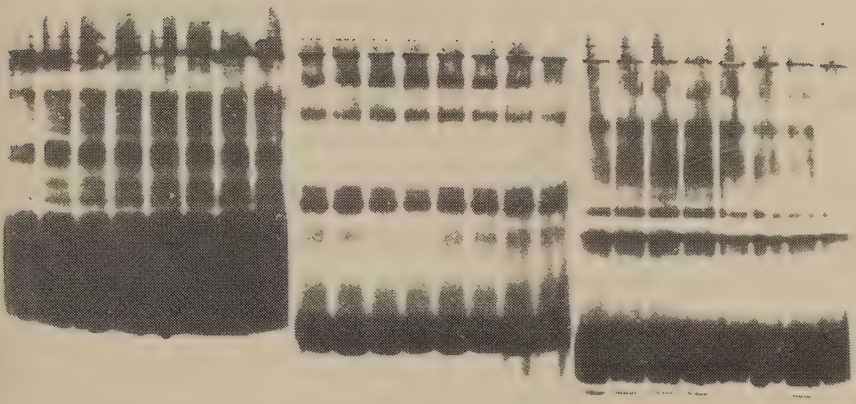
Abbildung 3: Die vollautomatische Proteinbestimmung erfolgte in einem Auto-Analyser-System mit Folin-Lowry Reagens. Die Zusammensetzung der verwendeten Reagentien ist im Text angegeben.

Nach erfolgter Polymerisation und Abkühlung des Gels stellt man die Kammer zunächst umgekehrt auf und nimmt die Bodenplatte ab. Ein Stück Filterpapier oder ein ganz feinmaschiges Perlonnetz wird auf den unteren Querschnitt der Kammer aufgelegt, um ein späteres Abrutschen der Gelplatte in die Elutionskammer während des Versuchs zu verhindern (11, 26). Auf dieses Perlonnetz bzw. Filterpapier wird die Elutionskammer und darauf eine Dialysemembran gelegt (8, 10, 12, 18). Anschließend erfolgt die Befestigung des Gelansatzstutzens und der oben beschriebenen Teile mit Hilfe von Messingschrauben, wie aus Abbildung 1 zu entnehmen ist. Auch hierbei bleibt die Kammer noch auf dem Kopf stehen. Die auf der Elutionskammer aufliegende Dialysemembran soll ein Einwandern der Proteine in den unteren Gelansatzstutzen verhindern. Zwischen den einzelnen Teilen der unteren Elutionskammer und dem Ansatzstutzen liegt Parafilm zur Abdichtung.

Nachdem alle Teile verschraubt sind, wird die Kammer in horizontale Stellung verbracht. Der Gelformer wird entfernt und mit Hilfe einer Mikropipette eine Serummenge von 120 l aufgetragen. Es muß sorgfältig darauf geachtet werden, daß beim Einfüllen der Proben keine Verletzung der Gelprobenschlitze erfolgt, da sonst die einzelnen Fraktionen schief laufen oder Verzerrungen innerhalb der Fraktionen resultieren. Um ein Auslaufen der Probe bei vertikaler Kammerstel-

lung zu vermeiden, wird der Probenauftragschlitz mit Paraffin (Schmelzpunkt + 43° C) ausgegossen (1). Nun wird die Kammer in vertikale Stellung gebracht. Das mit dem "Elutionspuffer" gefüllte Vorratsgefäß (Abb. 3) wird an einen Kapillarschlauch der Elutionskammer angeschlossen, wobei zu beachten ist, daß sämtliche Luftblasen in der Elutionskammer restlos entfernt werden. Dies läßt sich durch eine leichte seitliche Neigung der Elektrophoresekammer unter gleichzeitigem Absaugen am ehesten erreichen (10, 11, 21, 26). Der Kapillarschlauch für den Elutionspufferausfluß wird an einen Mikroschlauch von 0,235 ml/min Durchflußvolumen angeschlossen (das entspricht einem Elutionskammerdurchfluß von ca. 14 ml/h) und der Puffer mit einer Auto-Analyser-Pumpe der Firma Technicon kontinuierlich abgesaugt (8, 12, 18, 21). Die Elektrodengefäße entsprechen den von O. SMITHIES (36) bei seinen Elektrophoresen verwendeten Geräten. Die Brükken zwischen Elektrodengefäßen und Gelansatzstutzen werden mit Filterpapier der Firma Schleicher und Schüll hergestellt (21).

Nach Elektrodenanschluß erfolgt die Polung so, daß die Anode am unteren Ende der Elektrophoresekammer liegt. Ein Kühlaggregat (Kryomat TK 30 D) pumpt Wasser von + 6° C durch die Kühlwasserkammern. Eine Spannung von 50 V wird angelegt (11). Die Stromstärke liegt unter



Borsäurepuffer *Borsäure-Trispuffer 1:1* *Trispuffer*

Spannung: 200 V *Laufzeit : 13 h*

Abbildung 4: Fotographie von drei verschiedenen Gelplatten, bei deren Herstellung verschiedene Puffer verwendet wurden. Bei den hier beschriebenen Versuchen wurde ein Borsäure-Trispuffer im Verhältnis 1:1 verwendet. Die Zweckmäßigkeit dieses Puffers erhellt aus der scharfen Trennung der meisten Fraktionen ohne die oft übliche Verschmierung der Banden, wie sie zum Teil an der rechten und linken Gelplatte dieser Abbildung ersichtlich ist. Die genaue Zusammensetzung des Puffergemisches ist im Text beschrieben (23).

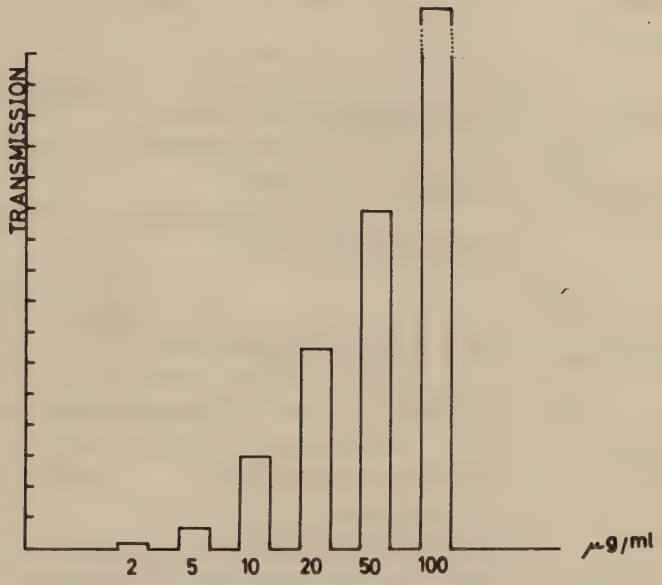
diesen Bedingungen bei 5 mA. Nach 10 Minuten wird auf 300 V erhöht. Bei dieser Spannung ergibt sich eine Stromstärke um 25 mA. Das Potentialgefälle beträgt bei 300 V ca. 20 V / cm.

Für die kontinuierliche vollautomatische Proteinbestimmung im Eluat wird eine Modifikation der Folin-Lowry Methode (15, 17) benutzt. Das entsprechende Fließdiagramm ist in Abbildung 3 wiedergegeben.

Es ist erforderlich, das Auto-Analyser-System mindestens drei Stunden vor Versuchsbeginn laufen zu lassen, damit beim Versuchsanfang eine einwandfreie Grundlinie vorliegt. Das Blasenmuster in den Mischspiralen muß völlig gleichmäßig laufen.

Im Auto-Analyser-Colorimeter wird die Durchlässigkeitsänderung bei 660 nm gemessen und auf den Schreiber mit einem Papiervorschub von 55 mm / h kontinuierlich aufgezeichnet.

Zur Steuerung der Empfindlichkeit wird der Skalenspreizer der Firma Technicon auf Stufe 4 dazwischengeschaltet. Eine Eichung wurde mit Azo-Albumin-Lösungen (2 - 100 µg / ml) durchgeführt. Diese Lösungen wurden direkt in das Auto-Analyser-System eingepumpt.



EICHKURVE MIT AZO-ALBUMINLÖSUNG

Abbildung 5: Bei der hier gezeigten Eichkurve wurde eine hochgereinigte Azo-Albumin-Lösung verwendet. Die Verdünnungsreihe wurde mit dem als "Elutionspuffer" verwendeten "Gelpuffer B" und "Gelpuffer C" im Verhältnis 1:1 hergestellt. Alle 15 min wurde die konzentriertere Probe in das System eingepumpt, danach mit dem Elutionspuffer die Grundlinie wiederhergestellt. Auch hier war, wie in allen anderen Versuchen, zwischen Colorimeter und Schreiber ein Vierfachspreizer zwischengeschaltet. Diese Eichkurve läßt einen Vergleich der Proteinmenge einzelner Fraktionen zu, ebenso eine Berechnung der wiedererhaltenen Proteinmengen.

Reagentien:

Gelpuffer B: 7.728 g Borsäure kristall.
(M.G. 61.83 Merck Nr. 165)
+ 520 ml 0.1 n NaOH
(Titrisol-Amp. Merck Nr. 9956)
ad 5000 ml Aqua dest.

Gelpuffer C: 5.03 g 0.1 m Citronensäure
(M.G. 210.14 Merck Nr. 245)
+ 46.033 g 1 m TRIS(hydroxymethyl)-aminomethan
(M.G. 121.14 Merck Nr. 8382)
ad 5000 ml Aqua dest.

0.1 m Citronensäure wird hergestellt aus 21.014 g Citronensäure ad 1000 ml H_2O, 1 m Trispuffer aus 121,14 g TRIS ad 1000 ml H_2O

Stärkepuffer: Gelpuffer B und Gelpuffer C im Verhältnis von 1:1

Elutionspuffer: gleiche Zusammensetzung wie Stärkepuffer

Brückenpuffer: 18.549 g Borsäure kristall.
(M.G. 61.83 Merck Nr. 165)
+ 60 ml 1 m NaOH
ad 1000 ml Aqua dest.

Reagentien zur Proteinbestimmung im Eluat:

Kupfer-Reagens: 5 g Kupfersulfat . 5 H_2O
(M.G. 249.68 Merck Nr. 2790)
+ 10 g Di-Na-Tartrat . 2 H_2O
(M.G. 230.08 Merck Nr. 6664)
ad 5000 ml Aqua dest.

Karbonat-Puffer: 106 g Na_2CO_3 wasserfrei (Merck Nr. 6392)
+ 1 Ampulle Titrisol (Merck Nr. 9956)
ad 5000 ml Aqua dest.

Phenol-Reagens: 200 g Na-Wolframat (Merck Nr. 6673)
+ 50 g Na-Molybdat
+ 1400 ml H_2O bidest.
+ 100 ml 85 %ige Phosphorsäure (Merck Nr. 573)
+ 200 ml HCl konz. (Merck Nr. 319)
10 Stunden am Rückflußkühler kochen

nach dem Abkühlen
+ 300 g Lithiumsulfat (Merck Nr. 5695)
+ einige Tropfen Brom
nochmals kurz aufkochen.
Diese Lösung ad 2000 ml Wasser.

Gebrauchsfertig ist die Lösung, wenn das Reagens mit Wasser im Verhältnis 1:3 versetzt ist.

Die Elektrophoresedauer betrug im Durchschnitt 8 - 10 Stunden. Sämtliche Versuche wurden unter den oben angegebenen Bedingungen mit verschiedenen normalen Humanseren durchgeführt.

2.3 Ergebnisse

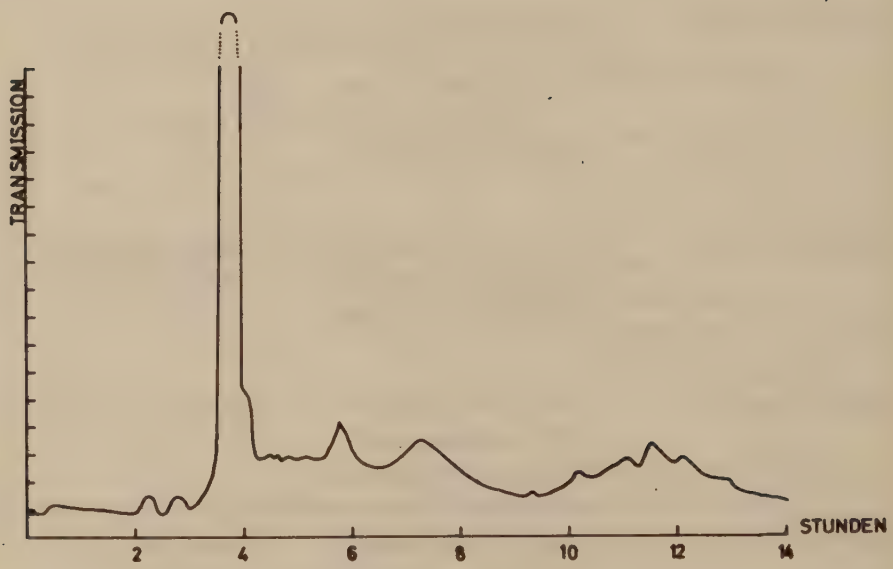


Abbildung 6: Humanserum, Gesamteiweiß 7.0 g / 100 ml

Papierelektrophorese:
48 % Albumin
4.6 % a_1-Globuline
7.4 % a_2-Globuline
11.2 % ß -Globuline
18.8 % y -Globuline

nach 2 h sind die Praealbumine eluiert
nach 3.5 h die Albuminfraktion
nach 4 - 6 h Postalbumine
nach 8 h bis zum Ende der Elektrophorese noch weitere 7 Fraktionen.

Auftrennung des Serums in 13 Fraktionen.

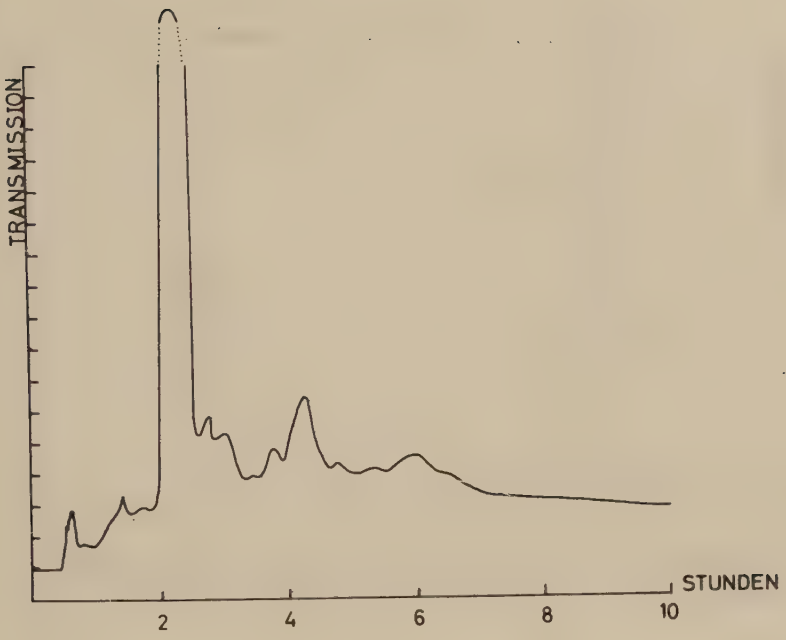


Abbildung 7: Humanserum, Gesamteiweiß 6.8 g / 100 ml

Papierelektrophorese: 56 % Albumin
4.3 % a_1-Globuline
8.7 % a_2-Globuline
11.6 % ß -Globuline
18.4 % y -Globuline

nach 2 h Praealbumine

nach 3 h Albumin

nach 4 h Postalbumine

nach 5 h bis zum Ende die Globulinfraktionen.

Auftrennung des Serums in 11 Fraktionen.

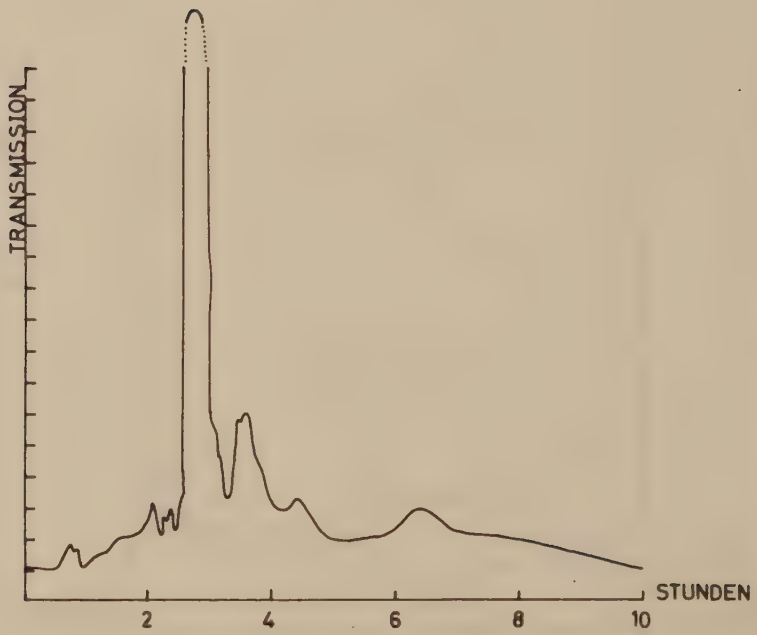


Abbildung 8: Humanserum, Gesamteiweiß 6.3 g / 100 ml

Papierelektrophorese: 52 % Albumin
5.2 % a_1-Globuline
8.7 % a_2-Globuline
12.8 % ß -Globuline
18.6 % y -Globuline

nach 2.5 h Praealbumine

nach 3 h Albumin

nach 4 h bis zum Ende 3 weitere Fraktionen.

Auftrennung des Serums in 6 Fraktionen.

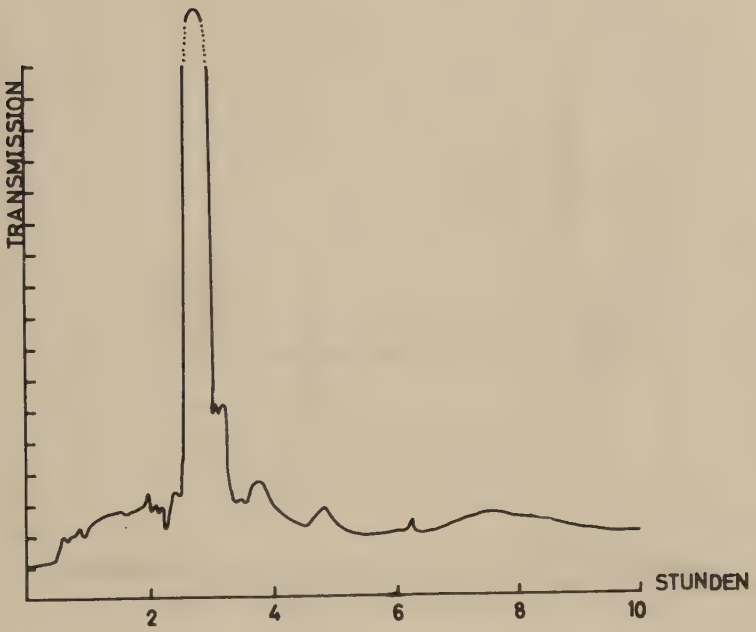


Abbildung 9: Humanserum, Gesamteiweiß 7.2 g / 100 ml

Papierelektrophorese: 54 % Albumin
4.9 % a_1-Globuline
6.3 % a_2-Globuline
12.1 % ß -Globuline
22.7 % y -Globuline

nach 2.5 h Praealbumine

nach 3.5 h Albumin

nach 4 h Postalbumine

nach 5 h bis zum Ende Globuline.

Auftrennung des Serums in ca. 8 Fraktionen.

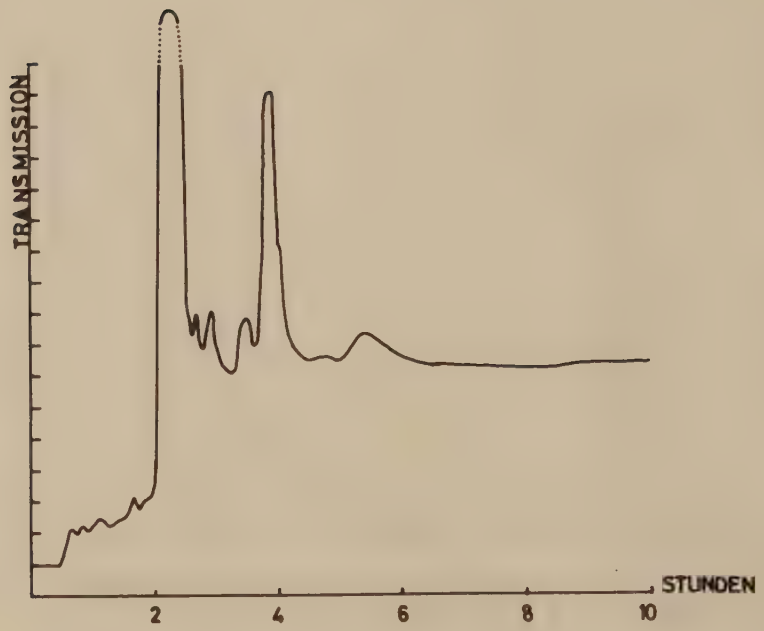


Abbildung 10: Humanserum, Gesamteiweiß 7.4 g / 100 ml

Papierelektrophorese: 49 % Albumin
7.4 % a_1-Globuline
18.3 % a_2-Globuline
10.6 % ß -Globuline
15.7 % y -Globuline

nach 2 h Praealbumine

nach 3 h Albumin

nach 4 h Postalbumine

nach 5 h bis zum Ende Globuline.

Auftrennung des Serums in 10 Fraktionen.

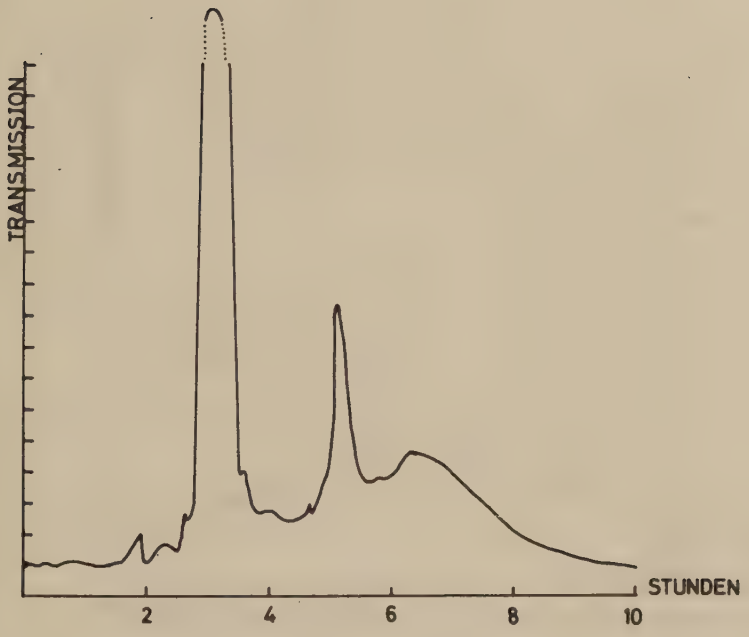


Abbildung 11: Humanserum, Gesamteiweiß 7.9 g / 100 ml

Papierelektrophorese: 63 % Albumin
6.2 % a_1-Globuline
8.3 % a_2-Globuline
12.7 % ß -Globuline
23.8 % y -Globuline

nach 2.5 h Praealbumine

nach 3.5 h Albumin

nach 4.5 h Postalbumine

nach 5 h bis zum Ende Globuline.

Auftrennung des Serums in 6 Fraktionen.

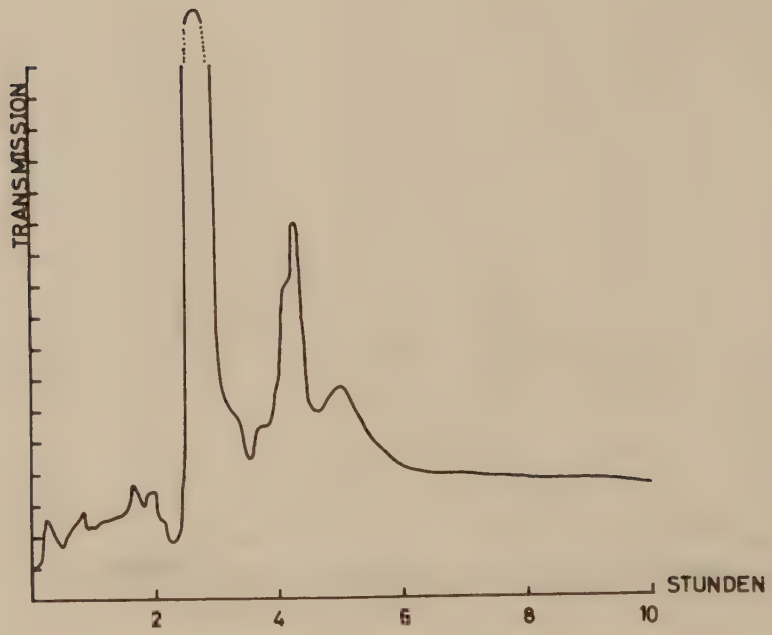


Abbildung 12: Humanserum, Gesamteiweiß 6.7 g / 100 ml

Papierelektrophorese: 63 % Albumin
4.8 % a_1-Globuline
9.2 % a_2-Globuline
7.3 % ß -Globuline
15.7 % y -Globuline

nach 2.5 h Praealbumine

nach 3.5 h Albumin

nach 4.5 h Postalbumine

nach 5 h bis zum Ende Globuline.

Auftrennung des Serums in ca. 9 Fraktionen.

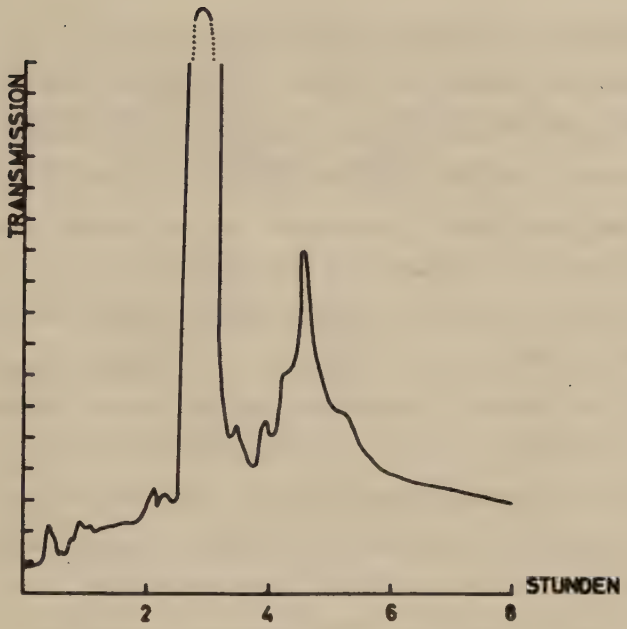


Abbildung 13: Es wurde das gleiche Serum wie bei dem in Abbildung 12 dargestellten Versuch verwendet:

nach 2.5 h Praealbumine

nach 3.5 h Albumin

nach 4.5 h Postalbumine

nach 5 h bis zum Ende Globuline.

Auftrennung des Serums in ca. 9 Fraktionen.

Diese Versuche Nr. 12 und 13 wurden durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit des Systems zu prüfen, da diese entschei - dend ist fur eine Verwendung der beschriebenen Apparatur zu präparativem Arbeiten. Ein Vergleich der beiden in Abbildung 12 und Abbildung 13 gezeigten Kurven ergibt eine fast identische Aufzeichnung der einzelnen Fraktionen. In Abbildung 13 ist die erste Postalbuminzacke besser von der Albuminzacke getrennt als in Abbildung 12, während in Abbildung 12 eine bessere Fraktionierung der letzten Globulinbande ersichtlich ist. Die beiden verwendeten Gele wurden an verschiedenen Tagen gegossen, außerdem war die Kühldauer des zweiten Gels um drei Stunden länger. Geringfügige Verschiedenheit der beiden Gelplatten kann sich demnach auf das Ergebnis der Fraktionierung auswirken.

Eine mehrmalige Verwendung der gleichen Gelfüllung ist mit der vorliegenden Apparatur nicht möglich, da sich durch die wahrend des Versuches entstehende Joule'sche Wärme die Probenauftragschlitze verziehen (21).

Die in Abbildung 7 und in Abbildung 11 dargestellten Versuche mußten wegen technischer Schwierigkeiten vorzeitig abgebrochen werden. Eine Einfärbung der Gelplatten mit Amidoschwarz 10 B ergab bei dem Versuch in Abbildung 7

noch drei im Gel verbliebene Fraktionen, die hätten eluiert werden können und im Versuch der Abbildung 11 noch vier weitere Fraktionen, die bei entsprechender Elektrophoresedauer noch registriert worden wären.

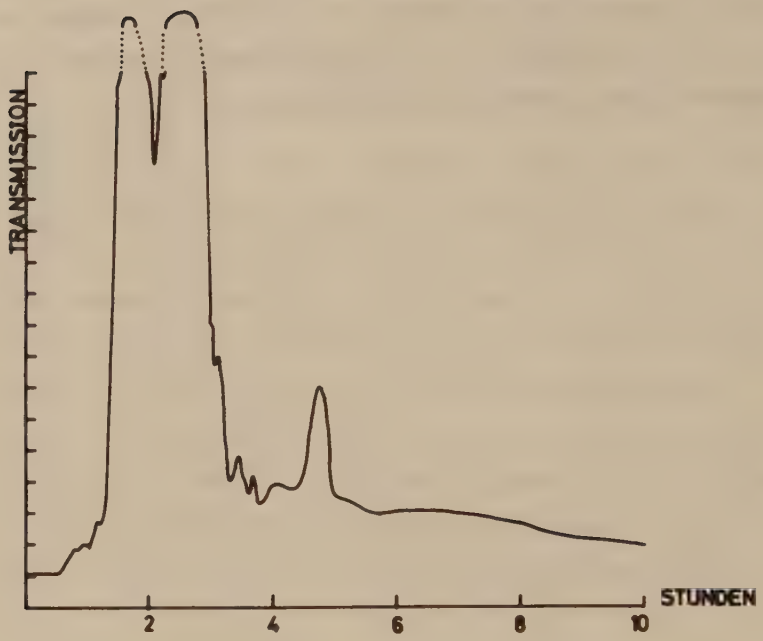


Abbildung 14: Humanserum, Gesamteiweiß 7.5 g / 100 ml
Albumingehalt 54 %

Die Kurve zeigt zwei Albuminbanden. Es handelt sich um einen Artefakt, der durch eine nicht genau vertikale Stellung der Elektrophoresekammer zustande kam, sodaß die in der Elutionskammer ankommende Albuminfraktion über das Gel verschmiert war und einen doppelten 'peak' ergab. Die sich an das Albumin anschließenden Proteinfraktionen können aus oben genannten Gründen nicht zugeordnet werden.

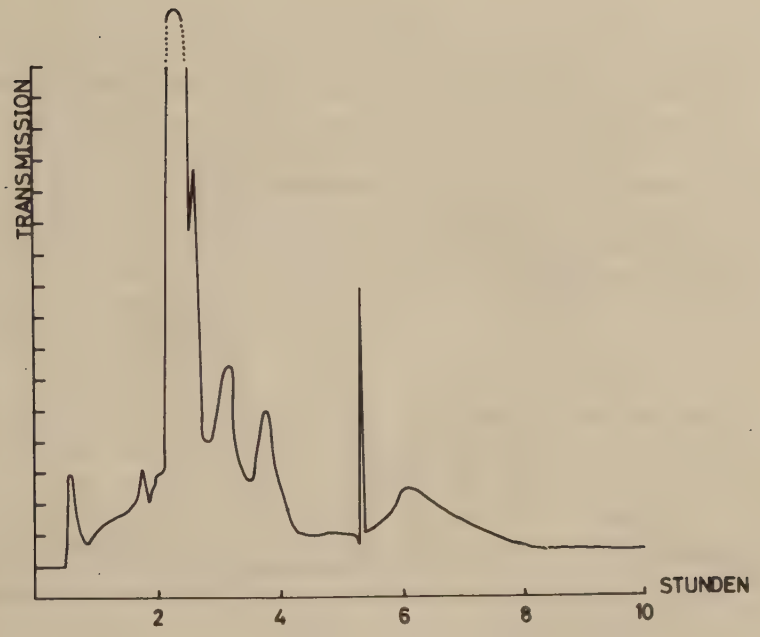


Abbildung 15: Humanserum, Gesamteiweiß 7.7 g / 100 ml

Papierelektrophorese: 34 % Albumin
6.8 % a_1-Globuline
13.0 % a_2-Globuline
15.7 % ß -Globuline
30.5 % y -Globuline

nach 2 h Praealbumine

nach 3 h Albumin

nach 4 h Postalbumine

nach 8 h eine Globulinfraktion.

Bei dem nach 5 h aufgetretenen 'peak' dürfte es sich um einen Artefakt handeln.

Auftrennung des Serums in 6 Fraktionen.

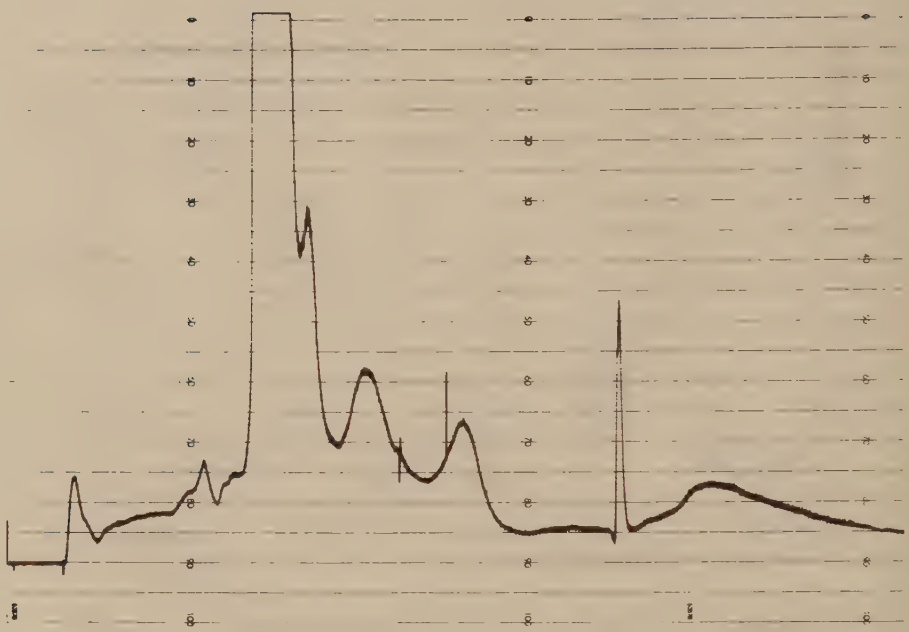


Abbildung 16: Diese Abbildung zeigt die verkleinerte Fotographie einer Originalkurve, die in Abbildung 15 umgezeichnet dargestellt ist. Samtliche Abbildungen der hier gezeigten Kurven sind aus Gründen der fotomechanischen Wiedergabe verkleinerte Umzeichnungen der Originalkurven.
Bei der Verkleinerung wurden die Abszissen im Verhältnis 2.5 : 1 und die Ordinaten im Verhältnis 1.5 : 1 umgezeichnet.

Zusammenfassend ergibt sich, daß mit dieser Elektrophoresekammer Humanserum bei einer durchschnittlichen Laufzeit von 10 Stunden in 6 bis 14 Fraktionen aufgetrennt werden kann. Dabei sind die Praealbumine in 2 bis 3 Stunden, Albumin nach 3 bis 4 Stunden, die Postalbumine im Durchschnitt nach 6 Stunden und die restlichen Globuline nach 8 bis 10 Stunden eluiert.

Die gesamte Flüssigkeitsmenge, in der die Proteine nach der Elution vorliegen, beträgt ca. 150 ml/h.

Im Praealbumin – Albumin – Bereich des Eluates werden Proteinkonzentrationen von ca. 0.10 mg/ml, im Postalbuminbereich von ca. 0.02 mg/ml und im Globulinbereich von ca. 0.02 mg/ml erreicht.

2.4 Diskussion

Zu einer näheren Charakterisierung der einzelnen gewonnenen Fraktionen wären Bestimmungen der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit und der molekularen Größe mit Hilfe der Ultrazentrifuge erforderlich (37, 39).

Da bei den hier durchgeführten Versuchen ähnliche Bedingungen herrschten wie bei denen von SMITHIES (34), soll ein Schema einer elektrophoretischen Auftrennung von Humanserum, wie SMITHIES (36) es aufzeichnete, zu einer teilweisen Identifikation benutzt werden. In dieser graphischen Darstellung ist ersichtlich, daß bisher nur einige der Serumfraktionen zugeordnet werden konnten.

So handelt es sich bei den beiden Fraktionen, die in allen Kurven direkt vor der hohen Albuminzacke liegen, um das saure a_1-Glycoprotein, das 'orosomucoid' (22, 33). Der vor diesem Orosomucoid auftretende 'peak' ist ein Komplex aus Polypeptiden und aromatischen Aminosäuren. Daß es sich dabei nicht um einen Artefakt, zum Beispiel durch Anschluß der Elektrophoresekammer an das Nachweissystem, handelt, konnte damit bewiesen werden, daß dieser 'peak' nicht registriert wurde, wenn die Kammer angeschlossen wurde und

gleiche Bedingungen wie bei einem der oben beschriebenen Versuche herrschten, aber kein Serum aufgetragen worden war (18).

Das Albumin konnte durch Verwendung einer hochgereinigten Azo-Albumin-Lösung von gleicher Wanderungsgeschwindigkeit bestimmt werden. Dem Albumin folgen die Fraktionen der Postalbumine, die noch nicht genauer identifiziert sind. In Abbildung 7 zum Beispiel dürfte es sich um die beiden der Albuminzacke anschließenden 'peaks' handeln. Der Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex und das Transferrin C schließen sich als zwei weitere Fraktionen an, wie sie in allen Kurven zum Teil als sehr hohe Banden sichtbar sind (14). In einigen Pherogrammen folgt noch das hitzelabile Glycoprotein, 'S a_2-Globulin'. Bei der Elektrophorese in Abbildung 6 konnten noch Fraktionen des Haptoglobins und das ß-Lipoprotein eluiert werden.

Zur Ermittlung der Eiweißrückgewinnung wurde eine Flächenberechnung der Kurven mit Hilfe der Millimeterpapiermethode durchgeführt. Abzüglich der Proteinmenge der y-Globuline, die in keinem Falle nachgewiesen wurden, konnten im Vergleich mit der Eichkurve (Abb. 5) ca. 70 bis 75 % des Serumproteins zurückgewonnen werden (11, 20). Bei der Albuminfraktion lag die Rückgewinnungsquote bei 85 bis 90 % (27).

Bei der ausschließlichen Verwendung von Humanseren stellt sich die Frage, warum die Anzahl der Fraktionen so unterschiedlich ist. Dies könnte zum Teil an der verschieden hohen Konzentration einzelner Unterfraktionen liegen (18). Die Proteinmengen waren wohl so gering, daß sie sich dem Nachweis durch das Auto-Analyser-System entzogen. Außerdem ist bei der langen Elektrophoresedauer mit einer Verzerrung und Verschmierung der Banden über die gesamte Gelfläche zu rechnen, sodaß diese Proteine nicht nachgewiesen wurden (8, 12, 18, 21, 26).

Weiterhin erhebt sich die Frage, warum in keinem Falle die y-Globuline eluiert werden konnten. Infolge des sehr hohen Molekulargewichtes und des starken Gelvernetzungsgrades wurde an eine Absorption dieser Globuline an das Gel gedacht (4, 10, 25, 30, 35). Eine spätere Einfärbung der Gelplatte und ein Vergleich der Anfärbbarkeit mit einer nicht benutzten Gelplatte dürfte diese Möglichkeiten zum Teil ausschließen.

Eine Absorption an der Dialysemembran (12), wie sie bei DUESBERG (8) speziell für das Cytochrom C beschrieben wurde, konnte nicht bewiesen werden. Die Dialysemembran wurde ausgewaschen und das Spülmittel in das Nachweissystem gegeben, wobei sich keine y-Globuline nachweisen liessen. Eine Einfärbung der Dialysemembran mit Amidoschwarz 10 B und der Vergleich mit einer unbenutzten Membran schlossen

auch diese Möglichkeit mit großer Wahrscheinlichkeit aus.

Eine Wanderung der Proteine zur Kathode war durch die Wahl eines Puffers mit hohem pH-Wert fast ausgeschlossen (8). Da an der kathodischen Seite nicht eluiert wurde, konnte durch eine Umpolung der Elektroden auch diese Möglichkeit ausgeschlossen werden (16).

Daß die y-Globuline eventuell im Serumauftragschlitz liegenbleiben und nicht wandern (16), wurde durch Anfärbung der Gelplatte nachzuweisen versucht. Dies war nicht der Fall.

Eine Verschmierung der y-Globulinfraktion über die gesamte Gelplatte und damit eine nicht nachzuweisende Elution kleinster Proteinmengen ist nicht anzunehmen, da diese Fraktion bei analytischen Elektrophoresen in einer scharf gebündelten Fraktion wandert (21, 34).

Es bleibt die Möglichkeit zu diskutieren, daß die y-Globuline in einzelne kleinere Bruchstücke zerfallen und mit anderen Fraktionen wandern (1, 19, 23). Diese Möglichkeit ist als wahrscheinlich anzunehmen. Die y-Globuline sind hitzeempfindlich und bei einer Spannung von 300 V ist die Joule'sche Wärmeentwicklung ziemlich hoch (21).

Als Hinweis für diese Annahme kann die Beobachtung gewertet werden, daß eine hochgereinigte y-Globulinlösung bei der Elektrophorese zwei Fraktionen ergab, deren Wanderungsgeschwindigkeit nicht mit derjenigen der y-Globuline übereinstimmt (25). Es kann sich dabei also um Bruchstücke dieser Fraktion gehandelt haben, die auf Grund stärkerer Hitzeentwicklung während der zehnstündigen Elektrophoresedauer zerfallen ist (21).

3. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Konstruktion einer Elektrophoresekammer beschrieben. Mit dieser ist es möglich, Humanserum in 6 bis 14 Fraktionen aufzutrennen und mit diesen einzelnen Fraktionsportionen präparativ weiterzuarbeiten. Einige Kurven sind dargestellt, die mit Hilfe des Folin-Lowry Reagens in einem Auto-Analyser-System die nachgewiesenen getrennten Proteine aufzeigen. Ein Puffer wird beschrieben, durch dessen Verwendung sich einzelne Proteinbanden während der Elektrophorese schärfer bündeln lassen und die elektroosmotischen Erscheinungen wie Verschmierung und Verzerrung der Proteine auf ein Minimum reduziert sind.

Die Fraktion der y-Globuline konnte nicht nachgewiesen werden, da diese anscheinend durch zu hohe Joule'sche Wärmeentwicklung zerfallen und als Bruchstücke geringeren Molekulargewichtes mit anderen Fraktionen wandern.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALTANER, C., GREGUSOVA, V.: Präparative Zonenelektrophorese von Eiweißstoffen an Stärkegel. Chemical Communications. 26, (1961): 1727 - 1729

2. AVRAMAES, U.: A method of Preparative Electrophoresis in horizontal Gels. Nature 202, (1964): 1005 - 1006

3. BEATON, G. J., SELBY, A. E., WRIGHT, A. K.: Starch Gel Electrophoresis of Rat Serum Protein. J. biol. Chem. 236 III, (1961): 2001

4. BLOEMENDAL, H.: The Effect of the Medium on Electrophoretic Separations. Anal. Chem. Acta 38 (1 - 2): 169 - 177

5. BOSMAN, T.: Vertical Electrophoresis in Acrylamid Gel: Apparatus and Procedure. Lab. P. 15 (1966): 435 - 437, 43

6. CONSDEN, H., GORDON, H., MARTIN, H.: Zit. nach: Prospekt über Elektrophoresegeräte der Firma SHANDON Frankfurt / Main. (1968): 2

7. DAVIS, B. J., ORNSTEIN, L.: A new high resolution electrophoresis method. Acad. Med. N. Y. (1959)

8. DUESBERG, P. H., RUECKERT, R. R.: Preparative Zone Electrophoresis of Proteins on Polyacrylamide Gel in 8 M Urea. Anal. Biochem. 11, (1965): 342 - 361

9. FINE, J. M., WASZCZENKOZ, E.: Preparation of Transparent Starch Gels after Electrophoresis. Nature 181, (1958): 269

10. GORDON, A. H., LOUIS, L. N.: Preparative Acrylamid Electrophoresis. A single Gel System. Anal. Biochem. 21, (1967): 190 - 200

11. HJERTEN, S., JERSTEDT, S., TRISELIUS, A.: Electrophoretic 'Particle' Sieving in Polyacrylamide Gels as Applied to Ribosomes. Anal. Biochem. 11, (1965): 211 - 218

12. HOCHSTRASSER, H., SKEGGS, L. T. JR., LENTZ, K. E., KAHN, J. R.: An Improved Column for Preparative Electrophoresis. Anal. Biochem. 6, (1963): 13 - 26

13. KÖNIG, H.: Zit. nach: Prospekt über Elektrophoresegeräte der Firma SHANDON Frankfurt / Main. (1968): 2

14. LANGE, V.: Zur Methodik der Zonenelektrophorese in Stärkegel. Biochem. Z. 333, (1961): 503 - 510

15. LOEWENBERG, J. R.: Cyanide and the Determination of Protein with the Folin Phenol Reagent. Anal. Biochem. 19, (1967): 95 - 9

16. LORBER, A.: Increased globulin fractionation by an improved vertical gel electrophoretic technique. J. Lab. clin. Med. 64, (1964)

17. LOWRY, O. H., FARR, A. L., RANDALL, R. J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. biol. Chem. 193, (1951): 265

18. MAIZEL, J. Jr.: Preparative Electrophoresis of Proteins in Acrylamide Gels. Annals of the New York Academy of Sciences. 121, 2 (1964): 382 - 390

19. MATSON, C. F.: Polyacrylamid Gel Electrophoresis A simple System using Gel Columns. Anal. Biochem. 13 (2), (1965): 294 - 302

20. MATSUI, K., YAEN, O. K.: Quantitative Starch Gel Electrophoresis. Anal. Biochem. 6, (1963): 491 - 503

21. MURRAY, K.: A Continuous Elution Method of Preparative Starch Gel Electrophoresis. Anal. Biochem. 3, (1962): 415 - 428

22. OPPENHEIMER, J. H., SURKS, M. I., SMITH, J. C.: Isolation and Characterisation of Human Thyroxine-binding Prealbumine. J. biol. Chem. 240, I, (1965): 173

23. PILZ, W., JOHAN, J.: Das Puffersystem TRIS-Essigsäure. Z. Anal. Chem. 215 (2), (1966): 105 - 109

24. PORATH, J., LINDNER, E. B., JERSTEDT, S.: Migration-elution of Zones in an Electrophoresis Column. Nature Vol. 182, (1958): 744

25. PUTNAM, F. W.: The Plasma Proteins. Academic Press N. Y. 1, (1960)

26. RACUSEN, D., CALVANICO, N.: Preparative Electrophoresis on Polyacrylamide Gel. Anal. Biochem. 7, (1964): 62 - 6

27. RADHAKRISNAMURTHY, B., DALFERES, E. R. Jr., BERENSON, G. S.: A simplified Column for Gel Electrophoresis. Biochem. Biophys. Acta 107 (2), (1965): 380 - 383

28. RAMSEY, H. A.: Thin-Layer Starch Gel Electrophoresis on Glass Slides. Anal. Biochem. 5, (1963): 83 - 9

29. RAVOO, E., GELLINGS, P. J.: Criteria for successfull separation by continuous electrophoresis and electrochromography in blocks and columns. Anal. Chem. Acta 38 (1 - 2), (1967): 219 - 232

30. RAYMOND, S., NAKAMICHI, M.: Electrophoresis in Synthetic Gels II. Effect of Gel Concentration. Anal. Biochem. 7, (1964): 225 - 232

31. RAYMOND, S., NAKAMICHI, M., AURRELL, B.: Acrylamid Gel as an Electrophoresis Medium. Nature 195, (1962): 697

32. REISFELD, R. A., LEWIS, U. J., WILLIAMS, D. E.: Disc Electrophoresis of Basic Proteins and Peptides on Polyacrylamid Gel. Nature 195, (1962): 281

33. SMITH, J. C., BERNSTEIN, G., SURKS, M. I., OPPENHEIMER, J. H.: A Method of Preparative Starch-Gel Electrophoresis. Biochem. Biophys. Acta 115, (1966): 81 - 87

34. SMITHIES, O.: Am Improved Procedure for Starch Gel Electrophoresis. Biochem. J. 71, (1958): 585 - 587

35. SMITHIES, O.: Molecular Size and Starch-Gel Electrophoresis. Arch. Biochem. Suppl. 1, (1962): 125 - 131

36. SMITHIES, O.: Advances in Protein Chemistry. Academic Press N. Y. 14, (1959): 65

37. STRICKLER, A.: Continuous Particle Electrophoresis: A New Analytical and Preparative Capability. Separation Science 2 (3), (1967): 335 - 355

38. SVENSSON, H.: Preparative Electrophoresis and Ionophoresis.
Advances in Protein Chemistry 4, (1958): 251

39. TOMBS, M. P.: The interpretation of Gel Electrophoresis.
Anal. Biochem. 13 (1), (1965) 121 - 132

40. VESSELINOVITCH, S. D.: A simple Method for Making Starch Gel Electrophoretic Strips transparent.
Nature 182, (1958): 665

Die einschlägige Literatur wurde bis einschließlich April 1968 berücksichtigt.

D A N K S A G U N G

Herrn Prof. Dr. med. W. Leppla gilt mein Dank für die Überlassung des Themas und die Hilfe bei der Korrektur der Arbeit.

Herrn H. Sutter danke ich für die Unterstützung beim Bau der Elektrophoresekammer und bei der Durchführung der einzelnen Versuche.

L E B E N S L A U F

31. Juli 1942	in Bonn geboren als Sohn des Arztes Dr. med. Heinz Müller und seiner Ehefrau Marianne, geb. Herbort
1949 - 1953	Besuch der Volksschule Schlüchtern
1953 - 1963	Realgymnasium der Ulrich-von-Hutten Schule in Schlüchtern
März 1963	Reifeprüfung
1963 - 1966	vorklinisches Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes
April 1966	ärztliche Vorprüfung
1966 - 1969	klinisches Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes
Juni 1969	ärztliche Prüfung
Juli 1969 - Juli 1970	Medizinalassistent am Kreiskrankenhaus Schlüchtern
14. Juli 1970	Approbation als Arzt
Ab 15. Juli 1970	Assistenzarzt auf der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Schlüchtern